

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Klára Jursová

Alternativní přenašeči leishmanií (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

Alternative vectors of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce:

RNDr. Jovana Sádlová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze:

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, paní RNDr. Jovaně Sádlové, Ph.D., za cenné rady, podněty a připomínky v průběhu zpracování této bakalářské práce.

Abstrakt

Životní cyklus prvoků rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) se odehrává mezi obratlovčím hostitelem a hmyzím přenašečem. Flebotomové, krevsající dvoukřídý hmyz z čeledi Psychodidae, byli donedávna považováni za jediné přenašeče, ve kterých jsou leishmanie schopné projít poměrně složitým morfologickým a funkčním vývojem a vytvořit infekční metacyklická stádia schopná infikovat dalšího hostitele. V posledních letech se ale ukazuje, že v přenosu některých druhů leishmanií mohou být zapojeny i jiné skupiny krevsajících členovců, tzv. alternativní vektorů. Tato bakalářská práce shrnuje poznatky o možnosti přenosu leishmanií alternativními vektory.

Klíčová slova: přenos leishmanií, krevsající členovci, Diptera, životní cyklus, vektorová kompetence

Abstract

The life cycle of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) alternates between vertebrate hosts and insect vectors. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) were supposed to be the only arthropod vectors supporting morphological and functional development of the parasite including production of infective metacyclic forms capable to infect the vertebrate host. Recently also other bloodsucking arthropods have been suggested for possible transmission of some *Leishmania* species. The bachelor thesis summarizes the recent knowledge about these alternative vectors of *Leishmania*.

Keywords: *Leishmania* transmission, bloodsucking arthropods, Diptera, life cycle, vector competence.

Obsah

Seznam zkratk

1	ÚVOD	1
2	EPIDEMIOLOGIE LEISHMANÍÍ	2
3	VÝVOJ LEISHMANÍÍ VE FLEBOTOMECH A ZPŮSOB JEJICH PŘENOSU	5
3.1	VÝVOJ LEISHMANÍÍ VE FLEBOTOMECH	5
3.2	KLÍČOVÉ MOMENTY PRO VÝVOJ LEISHMANÍÍ VE FLEBOTOMECH	7
3.3	PŘENOS LEISHMANÍÍ NA HOSTITELE.....	9
4	KRITÉRIA VEKTOROVÉ KOMPETENCE.....	10
5	ALTERNATIVNÍ VEKTOŘI.....	11
5.1	KLÍŠŤATA.....	11
5.2	BLECHY.....	16
5.3	TIPLÍCI	18
6	Závěr.....	24
	Seznam referencí.....	26

Seznam zkratek

BTV	–	katarální horečka ovčí (Bluetongue virus)
CDC	–	Centrum of Disease Control, CDC traps – typ pasti na hmyz s licencí této organizace
CL	–	kožní leishmanióza (cutaneous leishmaniasis)
DCL	–	difúzní kožní leishmanióza (diffuse cutaneous leishmaniasis)
ELISA	–	metoda sloužící k detekci protilátek pomocí imunoenzymatické reakce (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
IFAT	–	nepřímý imunofluorescenční test (Indirect Fluorescent Antibody Test)
LPG	–	lipofosfoglykany (lipophosphoglycans)
MC	–	kožně-slizniční leishmanióza (mucocutaneous leishmaniasis)
PBM	–	post blood meal, po sání krve
P	–	parazit
PCR	–	polymerázová řetězová reakce
PG	–	fosfoglykany (phosphoglycans)
PKDL	–	post-kala-azar dermální leishmanióza (Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis)
PM	–	peritrofická matrix
PSG	–	promastigote secretory gel - gel produkováný leptomonádami
RH	–	rezervoárový hostitel
RT PCR	–	PCR spojená s reverzní transkripcí (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
SV	–	stomodeální valva
TM	–	torakální mesenteron
V	–	vektor
VL	–	viscerální leishmanióza (visceral leishmaniasis)

1 ÚVOD

Leishmanie jsou prvoci v naší oblasti ne příliš známí, přesto celosvětově velmi významní, ať už z medicínského či veterinárního hlediska. U svých hostitelů způsobují onemocnění zvané leishmanióza, jehož formy se liší závažností od poměrně snadno léčitelných kožních lézí až po obtížně léčitelnou, často smrtelnou formu, napadající vnitřní orgány.

Životní cyklus leishmanií se odehrává mezi obratlovčím hostitelem a hematofágním přenašečem - flebotomem, který leishmanie přijme s krví během sání na infikovaném savci.

Díky společné koevoluci leishmanií s flebotomy si leishmanie vytvořily specifické mechanismy, díky kterým jsou schopny přežít uvnitř trávicího traktu flebotoma a zároveň projít poměrně složitým funkčním i morfologickým vývojem, jehož vyvrcholením je vznik infekčních stádií a možnost být šířeni na další obratlovčí hostitele.

Díky rozvoji molekulárních metod moderní vědy se v posledních letech začíná diskutovat o tzv. alternativních přenašečích. Jde o různé skupiny krevsajících členovců (zejména klíšťata, blechy a tiplíci), u kterých byla, především metodou PCR, detekována DNA leishmanií. Samotná přítomnost DNA však není důkazem, že je daný druh schopen leishmanie přenášet. Vědci se proto na základě laboratorního i terénního výzkumu pokouší možnost zapojení alternativních vektorů do přenosu leishmanií potvrdit či vyvrátit, což je velmi důležité zejména z epidemiologického a medicínského hlediska. Znalost všech přenašečů a způsobů přenosu leishmanií je základním předpokladem účinného boje proti těmto parazitům a jimi způsobovanému onemocnění, které postihuje stále větší množství lidské populace, obzvláště v chudých zemích.

Ve své bakalářské práci nejprve nastíním základní fakta epidemiologie leishmanií, způsoby jejich vývoje ve flebotomech a přenosu na obratlovčí hostitele. Stručně představím také kritéria vektorové kompetence, která jsou klíčová pro posouzení schopnosti hematofágních členovců přenášet parazity. Zejména bych však chtěla shrnout dosavadní poznatky ve výzkumu alternativních přenašečů leishmanií.

2 EPIDEMIOLOGIE LEISHMANIÍ

Prvoci rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) jsou paraziti savců včetně člověka, u něhož způsobují onemocnění zvané leishmanióza. Podle WHO se jedná o jedno ze šesti nejzávažnějších parazitárních onemocnění postihujících člověka. Po celém světě každoročně přibude 0,9 - 1,4 milionů nových případů (Alvar et al., 2012).

Dle klinických projevů dělíme leishmaniozy na kožní (cutaneous leishmaniasis, CL), kožně-slizniční (mucocutaneous leishmaniasis, MCL) a viscerální (visceral leishmaniasis, VL).

CL se projevuje kožními lézemi. Hlavní ohniska této nemoci jsou v Latinské Americe a na Středním Východě (podrobněji viz Tab. 1). Ve Starém světě je nejčastěji způsobována *L. major*, *L. tropica* a *L. aethiopica*, v Novém světě je jejím původcem *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, a další druhy, vč. *L. infantum chagasi*, která však častěji způsobuje viscerální formu. U pacientů s oslabenou buněčnou imunitou se může vyvinout tzv. difusní kožní leishmanióza (diffuse cutaneous leishmaniasis, **DCL**). Je známa ze Starého i Nového světa a projevuje se plošným šířením kožních ložisek po celém těle.

Původci **MCL** kromě tvorby kožních lézí napadají a destrukují sliznice a chrupavky oblasti nosu, dutiny ústní, hltanu a hrtanu. MCL se vyskytuje zejména v Brazílii a Latinské Americe, kde ji způsobuje *L. braziliensis* (Pearson a Sousa, 1996).

Nejnebezpečnější formou je **VL** (v Indii zvané také “kala-azar”) napadající vnitřní orgány. Ve Starém světě je jejím původcem *L. infantum*, jejímž hlavním obratlovčím hostitelem je pes domácí. V některých státech Asie (Pákistán, Indie, Nepál, Bangladéž) a východní Afriky (Súdán, Jižní Súdán, Etiopie) pak *L. donovani*. Na Americkém kontinentě působí VL *L. infantum*, která byla dříve označována druhovým jménem *L. chagasi*^{*}, ovšem moderní molekulárně-taxonomické metody jasně prokazují, že tato leishmanie je *L. infantum* recentně introdukována do Jižní Ameriky (Mauricio et al., 2000). U pacientů po zdárné léčbě VL působené druhem *L. donovani* se může projevit chronická forma onemocnění, post-kala-azar dermální leishmanióza (Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis,

^{*} Dále označena jako *L. infantum chagasi*, aby bylo zřejmé, že se jedná o *L. infantum* Nového světa.

PKDL). Projevuje se kožní dermatitidou, která se objevuje v období zhruba dvou let po vyléčení VL (Ashford, 2000).

Převážnou většinu leishmanióz řadíme mezi zoonózy. Zoonózy jsou infekce přirozeně kolující mezi zvířaty (rezervoárovými hostiteli), jsou však přenosné i na člověka. Spíše výjimečně se jedná i o antroponózy, v takovém případě je rezervoárovým hostitelem člověk (např. *L. donovani* na indickém poloostrově).

Spektrum hostitelů leishmanií je poměrně široké. Jako svůj přírodní rezervoár využívají okolo 30ti druhů savců, mezi něž patří divoká i domestikovaná zvířata. Jednotlivé druhy leishmanií mají většinou svůj okruh specifických hostitelů (Acosta et al., 2014). Přitom není výjimkou, že jeden druh savce může sloužit jako rezervoár více druhům leishmanií. Je to způsobeno podobnými ekologickými požadavky parazitů a tedy podobnými podmínkami, ve kterých společně s hostiteli a přenašeči žijí (Ashford, 1996).

Většina přirozených hostitelů přítomnost leishmanií ve svém těle toleruje. Zejména v oblastech, kde nejsou flebotomové aktivní po celý rok, musí leishmanie využít své hostitele jako přírodní rezervoár pro překlenutí takových období. Rezervoárovým systémem tedy nazýváme takový ekologický systém, ve kterém infekce přežívá dlouhodobě. Rezervoárovým hostitelem pak druh savce, díky kterému je dlouhodobě udržovaný stav populace parazita. V přenosu na člověka může hrát důležitou roli tzv. vedlejší hostitel, má-li trochu jiné ekologické požadavky než rezervoárový hostitel a dostává-li se do kontaktu s člověkem (Ashford, 1996).

Tab. 1: Medicínsky významné druhy leishmanií, jejich přenašeči, rezervoároví hostitelé, areál výskytu a klinická forma leishmaniózy.

Druh leishmnie	Přenašeči*	Rezervoároví hostitelé	Výskyt	Klinická forma onemocnění
<i>L. major</i>	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i>	Pouštní a stepní hlodavci, hlavně pískomilné	Střední Východ, S Afrika, Střední Asie, Indie, Pákistán, SZ Čína	CL, DCL
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i> <i>P.guggisbergi</i>	Lidé, damani, hlodavci	Střední Východ, Střední Asie, Indie, S Afrika	CL, VL, PKDL
<i>L. aethiopica</i>	<i>P. longipes</i> <i>P.pedifer</i>	Damani	Etiopie, Keňa	CL, DCL
<i>L. mexicana</i>	<i>Lu. olmeca olmeca</i>	Lesní hlodavci	Mexiko, Texas, Střední Amerika	CL
<i>L. braziliensis</i>	<i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. complexus</i> <i>Lu. carrerai</i>	Hlodavci, vačice, lenochodi	Brazílie, Venezuela	CL, MCL
<i>L. amazonensis</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Lesní hlodavci, vačnatci, <i>Cerdocyon thous</i>	Brazílie, oblast Amazonie	CL, DCL, MCL, VL, PKDL
<i>L. infantum</i>	<i>P. ariasi</i> <i>P. perniciosus</i> <i>P.perfiliewi</i> <i>P. langeroni</i> <i>P. neglectus</i>	Psovitě šelmy, pes domácí	Střední a JZ Asie, Čína, Střední Východ, Balkán, S a subsaharská Afrika,	CL, VL
<i>L. infantum chagasi**</i>	<i>Lu. longipalpis</i>	Psovitě šelmy, pes domácí	Mexiko, Střední s Jižní Amerika	CL, VL
<i>L. donovani</i>	<i>P. argentipes</i> <i>P. alexandri</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. martini</i> <i>P. celiae</i>	Lidé, hlodavci, šelmy	Pákistán, Indie, Nepál, S a V Čína, Súdán, Keňa, Etiopie	VL, CL,

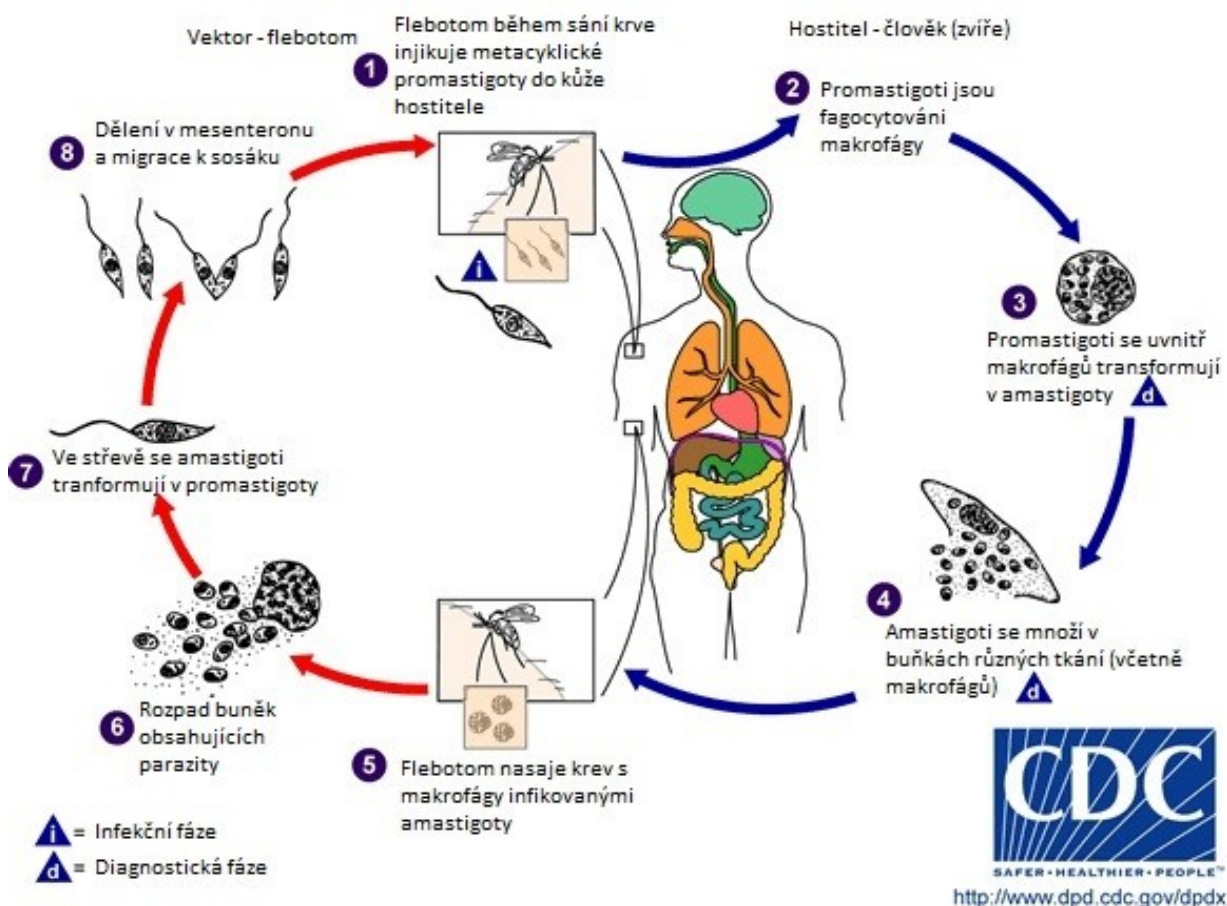
Zdroj: Pearson, 1996; Killick-Kendrick, 1999; Ashford, 1996; Sádlová, 1999; Bates, 2007.

* Pouze prokázání přenašeči

** *L. infantum chagasi* je *L. infantum* introdukována do Nového světa.

3 VÝVOJ LEISHMANIÍ VE FLEBOTOMECH A ZPŮSOB JEJICH PŘENOSU

Obr. 1: Schéma životního cyklu leishmanií.



Zdroj: Center for disease control and prevention, upraveno.

(<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>)

3.1 VÝVOJ LEISHMANIÍ VE FLEBOTOMECH

Životní cyklus leishmanií probíhá mezi obratlovčím hostitelem a hmyzím přenašečem – vektorem (viz obr. 1). Dominantními přenašeči leishmanií jsou flebotomové (Diptera: Psychodidae), drobný (obvykle 1,5 – 2 mm) dvoukřídlý hmyz, běžně se vyskytující v tropech a subtropích celého světa. Areál rozšíření některých druhů zasahuje i do mírného pásma.

Uvnitř trávicího traktu flebotoma dochází k poměrně složitému vývoji leishmanií, doprovázenému funkčními a morfologickými změnami, jehož výsledkem je vznik

infekčních (metacyklických) stádií, která jsou schopna během dalšího sání nakazit nového obratlovčího hostitele (včetně člověka).

Lokalizace leishmanií v trávicím traktu flebotoma se liší mezi třemi podrody: *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*. Druhy podrodu *Viannia* (např. *Leishmania braziliensis*) procházejí peripylariálním vývojem, zatím co zástupci podrodu *Leishmania* vývojem suprapylariálním a leishmanie podrodu *Sauroleishmania* mají buď hypopylariální nebo peripylariální vývoj (Lainson a Shaw, 1987).

Většina medicínsky významných leishmanií (podrod *Leishmania*) má **suprapylariální vývoj**, který je vázaný na mesenteron s následnou migrací ke stomodeální valvě. Proto se tomuto vývoji v následujícím textu věnuji podrobněji.

Vývoj leishmanií v přenašeči (viz obr. 2) začíná, když samička flebotoma nasaje krev s makrofágy, jež jsou infikovány **amastigoty** (malé 3 – 5 μm , kulaté, nepohyblivé stádium parazita). Spouštěčem morfologické přeměny a vývoje parazita je změna prostředí oproti obratlovčímu hostiteli – např. pokles teploty či zvýšené pH (shrnutí v Dostálová a Volf, 2012).

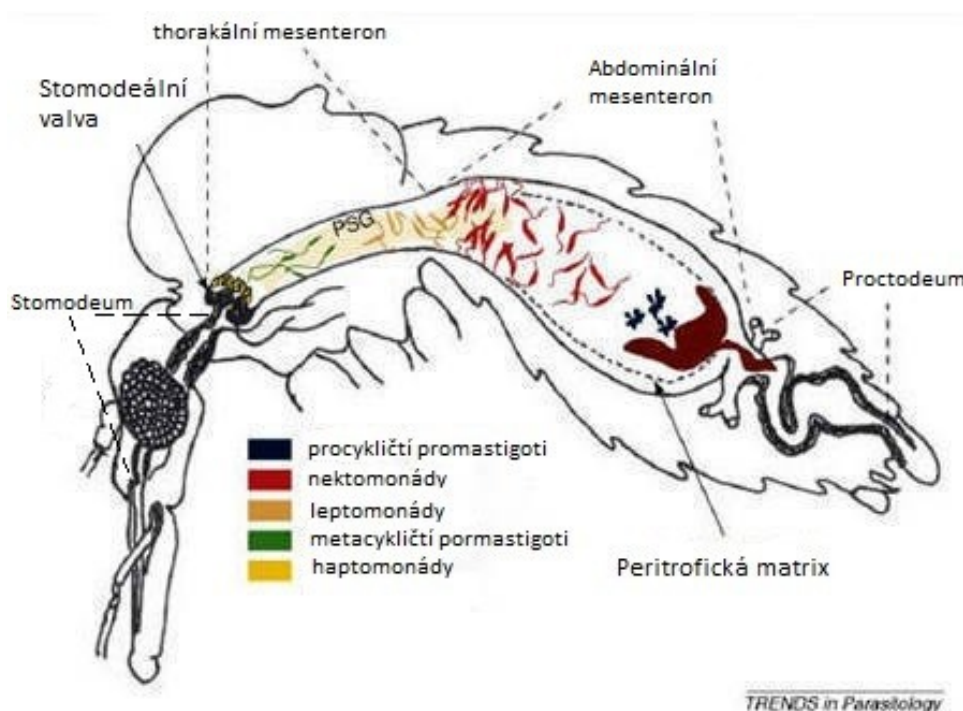
V trávicím traktu flebotoma se amastigoti začnou transformovat na **procyklické promastigoty** – krátké, mírně pohyblivé formy s krátkým bičíkem na předním (anteriorním) konci buňky. Jedná se o první dělicí se formu. Vyskytuje se v trávené krvi, která je od mesenteronu oddělena peritrofickou matrix (PM). Peritrofická matrix je extracelulární obal vylučovaný buňkami mesenteronu, složený z chitinu, proteinů a glykoproteinů (Lehane, 1997). Zhruba po 48 – 72 hodinách, zároveň s rozpadem peritrofické matrix, vznikají z procyklických promastigotů dlouhé **nektomonády**, které mají delší bičík, jejich tělo je štíhlé a protáhlé. Nektomonády unikají z peritrofické matrix do lumen mesenteronu, přichycují se bičíkem k epiteliální stěně (čímž se brání vypuzení ze střeva spolu s defekovanými nestrávenými zbytky potravy) a následně migrují do přední (thorakální) části mesenteronu, kde se později vyvíjí ve stádium **leptomonád**. Leptomonády se intenzivně dělí a transformují do **metacyklických promastigotů**, kteří jsou schopni nakazit nového obratlovčího hostitele během následného sání. Metacykličtí promastigoti jsou drobné, rychle se pohybující buňky s velmi dlouhým bičíkem. V oblasti stomodeální valvy se také vyskytují nepohyblivé **haptomonády**. Jedná se o formu s krátkým bičíkem, která zřejmě vzniká také z leptomonád. Haptomonády se přichycují

pomocí hemidesmozómů k stomodeální valvě flebotomů, což má význam pro přenos leishmanií na dalšího hostitele (shrnutí v Kamhawi, 2006; Bates, 2007).

Při **peripylariálním vývoji** migrují nektomonády po rozpadu peritrofické matrix do proctodea (zadní části trávicího traktu), kde se mění v leptomonády a pomocí hemidesmozómů se přichycují na stěnu pyloru a illea - čímž se brání defekaci z těla vektora. Po několika dnech množení vzniklá pohyblivá stadia promastigotů migrují anteriorně do mesenteronu a dále ke stomodeální valvě. Odtud probíhá další vývoj stejně jako u suprapylariálních parazitů (shrnutí v Sádlová, 1999).

Hypopylariální vývoj byl popsán pouze u podrodu *Sauroleishmanie* a je omezen na zadní část střeva.

Obr. 2: Schéma vývoje leishmanií v zažívacím traktu flebotoma.



Zdroj: Kamahawi, 2006; upraveno.

3.2 KLÍČOVÉ MOMENTY PRO VÝVOJ LEISHMANIÍ VE FLEBOTOMECH

Vývoj leishmanií ve flebotomovi trvá, v závislosti na druhu, zhruba 6 - 9 dní (Kamhawi, 2006). Během tohoto vývoje musí leishmanie čelit několika překážkám, které stojí v cestě jeho úspěšnému dokončení a zdárnému přenosu do obratlovčího hostitele.

O úspěchu vývoje leishmanií ve flebotomovi rozhodují hlavně faktory působící v časně fázi infekce (shrnuto v Ramalho-Ortigao et al., 2010).

První překážka, která na parazity několik hodin po nasátí čeká, jsou proteolytické enzymy, které zásadně změni pH střeva z mírně zásaditého (u nenasátých flebotomů) na silněji alkalické v rozsahu 7,5 - 9,5 (Dillon, 1993). Působení trávicích enzymů zřejmě část leishmanií nepřežije. Podle některých autorů jsou na degradační účinky enzymů nejvíce citlivá stadia transformující se z amastigotů na promastigoty (Pimenta et al., 1997). Leishmanie však nejsou proti proteolytickým enzymům zcela bezbranné. Jako ochrana jim slouží povrchové molekuly – hlavně fosfoglykany (PG) (Sacks et al., 2000). Kromě přímého vlivu trávicích enzymů působí na leishmanie také různé potencionálně toxické produkty uvolňované při trávení krve, jako je hemoglobin, resp. hem (Schlein a Jacobson, 1994).

Přeživší leishmanie, pokračující ve svém vývoji, čeká druhá překážka v podobě peritroické matrix. Pro flebotoma má mnoho důležitých funkcí, mimo jiné odděluje přijatou potravu (krev) od epitelu mesenteronu a tím tvoří ochranu proti patogenům přijatým s krví (Lehane, 1997) a zachycuje v sobě toxický hem (Pascoa et al., 2002). Bylo popsáno, že v časně fázi infekce také chrání PM leishmanie před rychlou difúzí trávicích enzymů (Pimenta et al., 1997).

Jakmile se dokončí trávení, PM se začne rozpadat a je i s nestrávenými zbytky potravy vyloučena z těla flebotoma ven. Leishmanie musí uniknout z rozpadající se PM a přichytit se k epitelu střeva, aby nebyly také vydefekovány. K rozrušení PM podle některých autorů využívají vlastní chitinázy, běžně ale spíše čekají na přirozený rozpad PM působený chitinázami flebotoma (Rogers et al., 2008).

Dalším nezbytným úkolem pro leishmanie je přichycení se k epitelu mesenteronu do doby, než jsou zbytky potravy peristaltickými pohyby střeva vypuzeny do proctodea. K tomuto přichycení dochází buď prostřednictvím lipofosfoglykanu (LPG), který se váže na galektin flebotoma nebo pomocí na LPG nezávislého mechanismu (Myšková et al., 2007).

Leishmanie následně migrují do přední části střeva a kolonizují oblast stomodeální valvy (SV). Stomodeální valva je část trávicího traktu oddělující mesenteron od stomodea. Běžně je uzavřená a otevírá se pouze během sání. Zajišťuje tak jednosměrný tok potravy a zabraňuje regurgitaci. Kolonizace leishmanií však SV ucpává a zabraňuje jejímu uzavření (Volf et al., 2004; Rogers et al., 2004).

To, že infikovaní flebotomové mají problém s přijímáním další potravy (tzv. “blocked fly”) popisují již Shortt a Swaminath (1928). Přesný mechanismus tohoto jevu byl ale popsán až v poslední době. Haptomonády přichycené k SV a intenzivně nahloučené leptomonády vytvářejí v oblasti thorakálního mesenteronu “zátku” zpevněnou ještě gelem (PSG = promastigote secretory gel) produkovaným leptomonádami (Rogers et al., 2002). Leishmanie navíc produkují i chitinolytické enzymy, které poškozují chitinovou vrstvu na stomodeální valvě, což také usnadňuje regurgitaci parazitů přítomných v thorakální části mesenteronu (Schlein, 1993; Rogers et al., 2008). Kolonizace a poškození stomodeální valvy parazity ztěžuje flebotomům plné nasátí a nutí je k opakovanému sání. Což je samozřejmě výhodné pro parazita, kterému se tím zvyšuje šance přenosu na více různých hostitelů (Bates, 2007).

3.3 PŘENOS LEISHMANIÍ NA HOSTITELE

Pro způsob přenosu z vektora na hostitele je klíčové, v jaké části trávicího traktu flebotoma se paraziti nacházejí. K přenosu během sání flebotoma do krve hostitele dochází u druhů se suprapylariálním a peripylariálním vývojem, které v poslední fázi svého vývoje kolonizují oblast stomodea a stomodeální valvu. Je-li dostatečné množství parazitů přítomno přímo ve stomodeu flebotoma, může k přenosu dojít jednoduše injikováním obsahu sosáku do pokožky hostitele během sání (Adler a Theodor, 1935). Dalším možným způsobem přenosu je přenos slinami, kdy jsou paraziti „naočkováni” do kůže hostitele spolu se slinami flebotoma (Killick-Kendrick et al., 1996).

Ale zatímco tyto způsoby přenosu jsou spíše hypotetické, nejčastěji se zřejmě uplatňuje přenos regurgitací - spolu se zpětně vyvrhnutou krví - kterou působí mechanická zábrana v oblasti stomodeální valvy (viz výše) (Volf et al., 2004).

Existuje také kontaminativní přenos, ke kterému dochází požitím infikovaného flebotoma nebo jeho zatřením do otevřených kožních ranek či sliznic. Tento typ přenosu se vyskytuje běžně u podrodu *Sauroleishmania*, kde probíhá hypopylariální vývoj (Lainson a Shaw, 1987).

4 KRITÉRIA VEKTOROVÉ KOMPETENCE

Pojem “vektorová kompetence” značí schopnost vektora přenášet daného parazita (Volf a Horák, 2007).

Zhruba z 900 druhů flebotomů je pouhých přibližně 70 druhů zapojeno do přenosu leishmanií (Ready, 2013). Flebotomy dělíme do šesti rodů, z nichž pouze dva jsou medicínsky významné: *Phlebotomus* ve Starém světě a *Lutzomyia* v Novém světě. Všichni potvrzení přenašeči leishmanií spadají do těchto dvou rodů, i když v posledních letech se spekuluje i o zapojení některých druhů rodu *Sergentomyia* (Maia a Depaquit, 2016). Skutečnost, že konkrétní druhy leishmanií mohou být přenášeny pouze určitými druhy flebotomů, je způsobena dlouhodobým společným vývojem těchto dvojic (vektor-parazit). Společnou koevolucí tedy vznikly výše popsané mechanismy, díky kterým jsou leishmanie schopné překonat všechny překážky spojené s vývojem v těle flebotoma.

Nyní, v době moderních molekulárních metod biologického výzkumu, je třeba si uvědomovat, že pouhá přítomnost DNA parazita (v našem případě leishmanie) v trávicím traktu jakéhokoli hematofágního členovce, nedokazuje, že daný členovec je jeho přenašečem. PCR metody jsou natolik citlivé, že detekují i nepatrné množství DNA – např. DNA *L. tarentolae* byla zjištěna i v mouchách čeledi Sarcophagidae, které nesají krev – zřejmě se do jejich trávicího traktu parazit dostal olizováním rány poraněného gekona (Tyc et al., 2013). Na základě dlouhodobých terénních i laboratorních výzkumů a pozorování byla stanovena určitá kritéria vektorové kompetence, která musí zkoumaný druh splňovat, aby mohl být prohlášen za prokázaného přenašeče (Killick-Kendrick, 1990, 1999; Lawyer a Perkins, 2000; Ready, 2013).

Tato kritéria by se dala shrnout následovně:

- Vektor se vyskytuje ve stejném prostředí (biotopu) jako rezervoárový hostitel a je mezi nimi silný ekologický vztah, včetně sezónní dynamiky výskytu.
- Vektor je přitahován rezervoárovým hostitelem a běžně na něm saje.
- Více než jednou byli izolováni promastigoti z jednoznačně identifikovaných volně žijících vektorů, a to ne z čerstvě nasáté krve.
- Paraziti z volně odchycených přenašečů jsou totožní s parazity izolovanými z rezervoárového hostitele.
- Vektor podporuje vývoj parazita a přenáší jej při sání na rezervoárovém hostiteli.

- Infekční formy parazita byly pozorovány v torakálním mesenteronu a v oblasti stomodeální valvy přirozeně infikovaných vektorů nebo přenašečů z laboratorních kolonií po xenodiagnostice (toto kritérium je nutno přizpůsobit danému druhu vektora a očekávanému způsobu vývoje parazita v něm).
- V laboratorních podmínkách se podařil experimentální přenos infekce z/na rezervoárového hostitele.

5 ALTERNATIVNÍ VEKTOŘI

Možnost zapojení alternativních vektorů do přenosu leishmanií je v posledních letech velmi diskutované téma. Především díky rozvoji molekulární biologie a moderních metod výzkumu se objevují indicie, že flebotomové nemusejí být jedinými přenašeči leishmanií. Pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce, z angl. Polymerase Chain Reaction) se podařilo objevit přítomnost leishmanií i u jiných skupin krevsajících členovců. Už na tomto místě je ale třeba podotknout, že pouhý nález DNA leishmanie v daném přenašeči není ještě zdaleka důkazem toho, že takový druh opravdu může leishmanií přenést na hostitele. Zkoumané jsou zejména klíšťata, blechy a tiplíci, těmito skupinám se proto budu v práci podrobně věnovat.

Problematika alternativních vektorů je zásadní z medicínského a veterinárního hlediska. Aby mohla moderní věda účinně bojovat proti leishmaniím a jimi způsobovanému onemocnění, je třeba co nejlépe poznat všechny přenašeče a způsoby přenosu.

5.1 KLÍŠŤATA

Klíšťata (třída Chelicerata, řád Acarina) jsou obligátně hematofágní ektoparaziti terestrických obratlovců. Jedná se o skupinu zahrnující stovky druhů, z nichž velké množství hraje významnou roli jako vektoři různých lidských i zvířecích patogenů (Walker et al., 2000). Vzhledem k tomu, jak stále roste lidská populace a aktivity člověka v přírodních biotopech, je pravděpodobné, že bude člověk pro klíšťata stále vyhledávanějším zdrojem potravy (Baneth, 2014).

Schopnost klíšťat přenášet leishmanie začala být experimentálně studována hlavně u klíšťat vázaných na psy, tedy rezervoáry *L. infantum* včetně její verze introdukované do Nového světa, označované tradičně jako *L. infantum chagasi*. Nejdůležitějším druhem klíštěte, jehož primárními hostiteli jsou psi, je velice hojný a kosmopolitně rozšířený druh *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).

Role klíšťat v přenosu leishmanií byla diskutována už ve starší odborné literatuře (Wenyon, 1932). V posledních desetiletích se pak začaly častěji objevovat práce, které tuto hypotézu pomocí nových molekulárních metod testují. V následujícím textu budu nejdůležitější práce uvádět v chronologickém pořadí.

První práce, která se snažila experimentálně prokázat roli *R. sanguineus* v přenosu *L. infantum* pochází z 80. let (McKenzie (1984) ex Dantas-Torres, 2011). Nymfy klíšťat, které sály na přirozeně infikovaných psech, se po vyvinutí v dospělé nechaly nasát na zdravých psech. Psům byly podány kortikosteroidy a odstraněna slezina pro potlačení imunity a indukci růstu parazitů. Po čtyřech týdnech byla na těchto psech nasáta neinfikovaná dospělá klíšťata a nymfy. Poté byla střeva těchto klíšťat kultivována s úspěšným výsledkem u skupiny klíšťat krmené na jednom ze dvou psů. Vzorky lymfatických uzlin tohoto psa byly také na leishmanií pozitivní (McKenzie (1984) ex Dantas-Torres, 2011). Bohužel od té doby nebyl podobný pokus opakován a publikován.

Více prací na toto téma se začalo objevovat počátkem tohoto století. Coutinho et al. (2005) experimentálně testovali, zda je *R. sanguineus* schopen přenést leishmanie na křečky. Pro výzkum bylo odchyceno 21 psů, kteří vykazovali symptomy viscerální leishmaniózy. Z těchto psů bylo odebráno 39 klíšťat (6 samiček, 11 samců a 22 nymf). Metodou PCR byla v šesti klíšťatech (2 samičky, 4 nymfy) detekována DNA rodu *Leishmania*. Autoři se rozhodli prokázat infektivitu klíšťat pokusem, kdy infikovaná klíšťata (získaná z nakažených psů) homogenizovali a tento homogenát podali peritoneálně a perorálně křečkům. Po šesti měsících byli infikovaní křečci usmrceni a podrobeni pitvě. Přítomnost leishmanií byla prokazována z jater a sleziny metodou PCR a z krve serologickým testem IFAT (nepřímý imuno fluorescenční test, z angl. indirect fluorescent antibody test). Obě metody prokázaly pozitivitu u více než 60% křečků infikovaných peritoneálně a 40% křečků infikovaných perorálně (Coutinho et al., 2005). Autoři interpretují své výsledky jako důkaz toho, že klíšťata mohou sloužit jako alternativní vektor leishmanií. Ovšem podstatným nedostatkem této studie je použití čerstvě nasátých

klíšťat, v nichž pravděpodobně leishmanie stále přetrvávaly ve formě amastigotů. Z epidemiologického hlediska by byl mnohem významnější pokus, kdy by byla hostitelům podána klíšťata po ekdyzi či alespoň po strávení krve.

Dantes-Torres et al. (2010a) prováděli výzkum prevalence leishmanií v klíšťatech a to paralelně na dvou místech, v oblasti jižní Itálie a severovýchodní Brazílie. Na obou lokalitách byla ze psů infikovaných leishmaniózou odebrána klíšťata druhu *Rhipicephalus sanguineus*. Následně byla klíšťata podrobena analýze metodou PCR. Výsledky odhalily přítomnost kinetoplastové DNA (kDNA) *Leishmania infantum* ve slinných žlázách klíšťat získaných v Itálii. V Brazílii byla kDNA leishmanií objevena u 12,3% zkoumaných klíšťat, zde autoři nerozlišovali lokalizaci leishmanií v rámci těla klíšťat (Dantas-Torres, 2010a).

Paz et al. (2010a) studovali vektorovou kapacitu pijáka hnědého (*R. sanguineus*) při přenosu psí viscerální leishmaniózy v laboratorních podmínkách. K tomuto experimentu použili dva psy přirozeně infikované leishmaniózou a jednoho psa zdravého. Ze psů byla odebrána klíšťata v různých fázích vývoje (larvy, nymfy i dospělci) a ponechána 4 – 15 dní v kontrolovaných podmínkách před dalším testováním. Poté byla klíšťata roztlačena na sklička a obarvené roztlaky byly prohlíženy pod světelným mikroskopem. Pouze v jednom z mnoha set vzorků byla objevena bičíkatá forma parazita, ovšem autoři sami podotýkají, že lze určit jen čeleď Trypanosomatidae, nelze však vyloučit, že šlo o zástupce rodu *Crithidia* či *Trypanosoma*. Část klíšťat byla testována také metodou PCR. Všechna klíšťata, která sála na infikovaných psech, byla pozitivní na kDNA rodu *Leishmania*, s výjimkou jedné skupiny larev. Kontrolní skupina klíšťat, která sála na zdravých psech, byla na DNA leishmanií negativní. Na kultivačním médiu byla pěstována kultura parazitů, růst leishmanií však nebyl zaznamenán. Autoři jsou tedy spíše skeptičtí a na základě své studie nepotvrzují vektorovou kompetenci *R. sanguineus* pro *L. infantum* (Paz et al., 2010a).

Paz et al. (2010b) zkoumali u psů v oblasti Belo Horizonte v Brazílii vztah mezi infestací klíšťaty (*R. sanguineus*) a blechami (*C. felis felis*) a přítomností protilátek proti leishmaniím. Vzorky krve od 5556 psů otestovali testem ELISA (metoda sloužící k detekci protilátek pomocí imunoenzymatické reakce, z angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) a IFAT. Z celkem 432 psů, kteří byli pozitivní v obou testech, náhodně vybrali 200 séropozitivních psů a odebrali z nich klíšťata a blechy. Ty odebrali také z 200 náhodně vybraných séronegativních psů. Ektoparaziti byli rozděleni na infikované

a neinfikované bez ohledu na míru infekce. Infestace klíštětem *R. sanguineus* byla vyšší u séropozitivních psů (38,5 %) ve srovnání se séronegativními (29 %). Míra infestace blechou *C. felis felis* byla také vyšší v séropozitivních psů (36,5 %) než u séronegativních (15 %). Pravděpodobnost séropozitivity psů byla o 53 % vyšší u psů zamořených klíšťaty a o 300 % vyšší u psů zamořených blechami ve srovnání s nezamořenými zvířaty (Paz et al., 2010b). Autoři tento výsledek interpretují jako jeden z důkazů podporujících roli těchto ektoparazitů v přenosu leishmanií v psí populaci.

Na výzkum transovariálního přenosu *L. infantum* v klíšťatech *R. sanguineus* se zaměřila studie Dantas-Torres et al. (2010b). V laboratorních podmínkách uměle naočkovali samice klíšťat promastigoty *L. infantum*. Posléze byla tato klíšťata, stejně jako jejich vajíčka a larvy, testována metodou PCR na přítomnost kDNA leishmanií. Přičemž klíšťata a vajíčka byla testována přibližně 5 týdnů po naočkování infekce, zatímco larvy až po 4 měsících. Všechna testovaná klíšťata byla pozitivní, taktéž polovina vajíček a čtyři skupiny larev byly pozitivní na kDNA *L. infantum*. Tato studie poprvé upozorňuje na možnost transovariálního přenosu leishmanií u klíšťat (Dantas-Torres et al., 2010b)

O rok později vyšla práce, která se dá považovat za pokračování výše uvedené studie. Dantas-Torres et al. (2011) opět zkoumali transovariální přenos leishmanií, nyní však u přirozeně infikovaných klíšťat *R. sanguineus*. V jižní Itálii, kde je psí leishmání endemická, byla z infikovaných psů posbírána klíšťata. Celkem 97 samic klíšťat bylo po vykladení testováno metodou PCR. Stejně byla testována i část vajíček a později larvy. Výsledky prokázaly k DNA rodu *Leishmania* u 25 samic klíšťat a také u nakladených vajec od 39 samic. Ze 160 testovaných larev bylo pozitivních 93. To, že pozitivní byla i některá vejce negativních samic, autoři vysvětlují možností přítomností PCR inhibitorů u nasátých samic.

Obě výše popsané studie ukazují, že kDNA může být transovariálně předávána ze samic klíšťat na jejich larvy a naznačují tak možnost, že klíšťata *R. sanguineus* mohou napomáhat v udržování populace *L. infantum* v přírodě (Dantas-Torres et al., 2011).

Prevalenci *L. infantum* v klíšťatech a blechách a jejich životaschopnost zkoumali Colombo et al. (2011) v oblasti Sao Paula. K detekci DNA byl použit RV1-RV2 marker specifický pro LT1 fragment kDNA leishmanií komplexu *L. donovani*. Prevalence byla poměrně vysoká, *L. infantum* byla detekována u 28,3 % blech, 23,3 % nymf, 50% samic a 33,3 % samců klíšťat. Zarážející je, že autoři neuvedli druh blechy ani klíštěte, a tak

můžeme (podle odkazů v úvodu práce) pouze předpokládat, že se jedná opět o *Ctenophalides felis* a *Rhipicephalus sanguineus*, nejčastější druhy v této oblasti. Ze psů pozitivních na leishmaniozu byla odebrána klíšťata, která byla zkoumána pomocí RT PCR. Touto metodou se amplifikuje RNA, která je důkazem přítomnosti živých parazitů v těle zkoumaného členovce. Klíšťata ve stádiu nymfy byla udržována v laboratorních podmínkách až do stádia dospělce, kdy byly opět provedeny testy RT PCR. Výsledky potvrdily přítomnost RNA leishmanií v čerstvě vylíhlých dospělcích, cDNA syntetizována z RNA byla poté kvantifikována pomocí real-time PCR. Tento výsledek prokazuje schopnost leishmanií přežít v klíšťatech ekdyzi (Colombo et al., 2011).

Prevalence leishmanií u klíšťat psů byla také předmětem studie Solano-Gallego et al. (2012). V endemické oblasti psí leishmaniózy ve střední Itálii byla pro pokus odebrána klíšťata (*R. sanguineus*) ze psů s klinickými příznaky leishmaniózy a také ze zdánlivě zdravých psů. Všichni psi byli ověřeni sérologickým testem a real-time PCR (primery specifické pro *L. infantum*, druhová identita leishmanií ověřena i sekvenací), ze které vyšlo 12 % psů pozitivních na leishmanie. Klíšťata (samice i samci) byla testována stejnou real-time PCR. Z celkového množství 128 odebraných klíšťat bylo 10 % pozitivních na DNA *L. infantum*, přičemž se jednalo hlavně o samce. Na této studii je překvapivé, že většina PCR-pozitivních samců klíšťat byla odebrána ze séronegativních i PCR-negativních psů (Solano-Gallego et al. 2012). Autoři tento fakt vysvětlují možnou migrací samců mezi společně ubytovanými psy, zřejmě v souvislosti s pářením.

L. infantum byla metodou PCR detekována u 5 z 9 klíšťat *I. ricinus* (55 %) a u 2 ze 73 *R. sanguineus* (3 %) také v rámci studie mapující výskyt přirozených infekcí klíšťat v Itálii (Trotta et al., 2012).

Úlohou pijáka hnědého, jakožto možného přenašeče leishmaniózy u volně žijících psů v Brazílii se zabývala i další studie zveřejněná roku 2015. Medeiros-Silva et al. (2015) testovali klíšťata a krev nakažených psů. Krevní vzorky psů byly testovány imunoanalýzou ELISA, testem na protilátky IFAT a testem DPP. Následně byla z pozitivních psů odebrána klíšťata (samice, samci a nymfy) a jejich slinné žlázy a střevo zkoumány metodou PCR. Ta v 29,5 % slinných žláz a 27,3 % střev klíšťat ukázala přítomnost kDNA leishmanií. Na kultivačním médiu se úspěšně podařilo kultivovat *L. infantum*, přičemž životaschopné leishmanie byly úspěšně vyisolovány i z vydefekovaných samců klíšťat. Výsledky této studie tedy naznačují, že leishmanie mohou v klíšťatech *R. sanguineus* přetrvávat i po

strávení krve. Pomocí dalších studií je potřeba objasnit, jak dlouho po trávení krve vydrží v klíšťatech různé formy leishmanií (Medeiros-Silva et al., 2015).

Výsledky výše zmíněných studií ukázaly, že klíšťata *R. sanguineus*, živící se na psech (přirozeně) infikovaných *L. infantum*, vykazují poměrně velkou prevalenci leishmanií (10 – 50 %). Tedy dokonce vyšší, než bývá detekována u flebotomů (zde je často menší než 1 %, viz např. Martin-Sanchez et al., 2006). To může být ovšem dáno tím, že klíšťata byla sbírána přímo z infikovaných zvířat a ne ze vzorku celé populace, jako je tomu při odchytu flebotomů do světelných nebo lepových pastí. Navíc není vyloučeno, že ve studiích, kde důkazem přítomnosti leishmanií byla pouze IFAT či PCR amplifikace k DNA bez následné sekvence vybraných genů, mohlo dojít i k záměně s rodem *Leptomonas*. Obecně vzato ale přítomnost leishmanií v klíšťatech sajících velké objemy krve na infikovaných psech není příliš překvapivá a vysoká prevalence sama o sobě nemůže být považována za důkaz zapojení klíšťat do přenosu leishmanií. Z epidemiologického hlediska jsou významnější zjištění, že DNA leishmanií je přítomna nejen ve střevě, ale i ve slinných žlázách klíšťat (Dantas-Torres, 2010a; Medeiros-Silva et al., 2015), dále pak že promastigoti leishmanií jsou v klíšťatech odebraných z nakažených psů životaschopné (Medeiros-Silva et al., 2015) a přežijí i ekdyzi (Colombo et al., 2011) a mohou být přenášeny i transovariálně (Dantas-Torres et al., 2010b, 2011). Byla naznačena možnost perorálního přenosu leishmanií pozřením infikovaného klíštěte psem (Coutinho et al., 2005), ovšem k této práci lze mít podstatné námitky. Významnější je zdařilý přenos infekce sáním infikovaných klíšťat na imunisuprimovaných psech (McKenzie (1984) ex Dantes-Torres, 2011). Tyto výsledky jsou zajímavé a nutí nás vážně uvažovat o roli klíšťat coby vektorů viscerální leishmaniózy psů. Ovšem stále jsou ještě nedostačující pro potvrzení role klíšťat jako vektora leishmanií (Medeiros-Silva et al., 2015; Dantas-Torres 2011).

5.2 BLECHY

Dalšími hojnými hematofágními ektoparazity podezřelými z přenosu leishmanií jsou blechy (třída Insecta, řád Siphonaptera). Řada faktorů, jako způsob a délka sání a trávení krve, blízký kontakt s hostiteli a časté změny hostitelů, predisponují blechy k tomu, být vhodnými vektory pro přenos infekčních patogenů. Možnost jejich zapojení do

přenosu leishmanií je zkoumána hlavně v Brazílii. Nejčastěji testována v tomto smyslu je blecha kočičí (*Ctenocephalides felis felis*) parazitující na kočkách a psech domácích a dalších psovitých šelmách. V jižní Americe je to např. maikong (*Cerdocyon thous*), který se vyskytuje v Amazonii a SV Brazílii.

Coutinho a Linardi (2007) využili psy vykazující příznaky leishmaniózy, u nichž testem IFAT infekci *L. infantum chagasi* potvrdili. Z těchto psů byly odebrány a dále zkoumány blechy *Ctenocephalides felis felis*. Metodou PCR bylo analyzováno 144 blech, přičemž u 43 z nich byla potvrzena kDNA rodu *Leishmania*.

V další části experimentu se, stejně jako v předchozí studii prováděné na klíšťatech (Coutinho et al., 2005), vědci pokusili prokázat schopnost blech infekci přenášet. Blechy sesbírané z nakažených psů byly homogenizovány a peritoneální či perorálně podány křečkům. Po půl roce byli křečci usmrceni a podrobeni zkoumání. Krev křečků byla analyzována testem IFAT a játra se slezinou metodou PCR. Z 36 zkoumaných křečků 6 zemřelo před koncem pokusu. Test IFAT ukázal 4 křečky na leishmanií pozitivní, zatímco PCR test odhalil DNA leishmanií u 40 % křečků infikovaných peritoneálně a 12,1 % křečků infikovaných perorálně. Spojení obou testů ukázalo 16 z 30 přeživších křečků pozitivních na infekci, ovšem pouze dva křečci byli pozitivní v testu IFAT i PCR zároveň (Coutinho a Linardi, 2007). Přítomnost leishmanií však nebyla potvrzena mikroskopickým pozorováním obarvených otisků jater a sleziny křečků, a jak sami autoři podotkli v diskuzi, PCR i IFAT testy dávají zkřížené reakce mezi leishmaniemi a *Leptomonas* spp., což snižuje věrohodnost této studie.

V roce 2009 vyšla metodicky velice obdobná vědecká studie (Ferreira et al., 2009) zaměřená na roli blech (*Ctenocephalides felis*) v přenosu leishmanií v oblasti Sao Paula. Ze psů, sérologicky pozitivních na leishmanie a vykazujících klinické příznaky onemocnění, byly odebrány blechy, které byly intraperitoneálně inokulovány křečkům. Křečci byli po čtyřech měsících usmrceni a jejich krev podrobena testu ELISA a slezina zkoumána metodou PCR pro detekování rodu *Leishmania*. Metodou PCR bylo detekováno 45 % pozitivních vzorků, a obě metody daly pozitivní výsledek v 18 % případů. Tyto výsledky nejsou sice, vzhledem k výsledkům předchozí studie (Coutinho a Linardi, 2007) překvapivé, opět ale neprokazují přenos leishmanií blechami, jak autoři deklarují.

Další studie zaměřená na detekci *L. infantum* u psů, koček a jejich ektoparazitů byla provedena opět v Brazílii (de Moraes et al., 2013). Vzorky krve odebrané

asymptomatickým psům a kočkám byly otestovány na přítomnost leishmanií pomocí PCR amplifikace kDNA *L. infantum* a následné sekvence získaných ampliconů. Z celkem 280 vzorků krve bylo více jak 70 % pozitivních na *L. infantum*. Ektoparaziti z nich odebrání byli identifikováni jako blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*), piják hnědý (*Rhipicephalus sanguineus*) a veš druhu *Heterodoxus spiniger*, přičemž na více než 18 % psů sálo více druhů parazitů. Ze 117 ektoparazitů bylo necelých 44 % pozitivních na *L. infantum*; konkrétně 58 % *C. felis*, 40 % *R. sanguineus*. a 30 % *H. spiniger* (de Moraes et al., 2013).

Blechy, stejně jako klíšťata či jiní hematofágní členovci mohou nasát leishmanie spolu s krví, kterou se živí. Detekce DNA leishmanií, či samotných leishmanií ve členovcích ovšem nedokazuje, že daný členovec je vektorem. Výsledky těchto studií tedy pouze ukazují, že leishmanií přítomné v blechách, které se nasály na infikovaných psech, mohu být životaschopné (Coutinho a Linardi, 2007). Nepodávají však žádný důkaz o tom, že by blechy byly schopny přenášet leishmanie v přírodě. Proto nemohou být blechy považovány za prokázané vektory leishmanií (Otranto a Dantes-Torres, 2010).

5.3 TIPLÍCI

Tiplíci jsou krevsající dvoukřídý hmyz (Diptera: Ceratopogonidae). Patří mezi nejhojnější hematofágní hmyz vyskytující kosmopolitně ve většině obydlených částí světa včetně České republiky. Tiplíci jsou významnými přenašeči velkého množství zvířecích i lidských patogenů jako jsou filarie a arboviry, z nichž nejznámější je katarální horečka ovčí (angl. Bluetongue virus - BTV) (Mellor et al., 2000). Je třeba zdůraznit, že (stejně jako u flebotomů) krev sají pouze samice, proto také jediné samice mohou přenášet infekční patogeny získané s krví hostitele. V následujícím textu uvedu zásadní práce terénního i laboratorního výzkumu spojené s rolí tiplíků v přenosu leishmanií.

Ačkoli jsou alternativní vektorů leishmanií tématem spíše posledních desetiletí, první zmínka o tiplících, coby potenciálních přenašečích leishmanií, pochází již z roku 1925, kdy Christophers et al. (1925) ve své práci zkoumali tiplíky sající na lidech nakažených leishmaniózou (Christophers et al., 1925). Autoři pitvali krevsající hmyz nasátý na pacientech infikovaných *L. donovani*, ovšem nenašli žádného pozitivního tiplíka (druh *Culicoides macrostoma*), zatímco mezi flebotomy druhu *P. argentipes* detekovali 25 % pozitivních samic.

Znovu se pak téma tiplíků jako možných přenašečů leishmanií začalo řešit počátkem tohoto století. Zájem o ně souvisí s objevem leishmanií na australském kontinentu. Prvním dokladem o výskytu autochtonní leishmaniozy v Australii byla práce Rose et al. (2004). Leishmanie byly vyizolovány z klokana rudého (*Macropus rufus*), u kterého se infekce projevovala kožními lézemi v oblasti uší, nosu, chodidel a varlat. Vektor byl však neznámý. Tato leishmanie byla v roce 2011 zařazena do druhového komplexu *L. entriettii* (Dougall et al., 2011), později povýšeného na poddruh *Mundinia* (Espinosa et al., 2016) a recentně popsána jako *L. macropodum* (Barrat et al., 2017). Proto se Dougall et al. (2011) zaměřili na analýzu flebotomů jako přenašečů leishmanií v Austrálii. Kombinací různých druhů pastí, které byly umístěny v místech pravděpodobného výskytu hmyzu, byly shromážděny vzorky flebotomů. Z 97% šlo o flebotomy druhu *Sergentomyia queenslandi*. Tiplíci rodu *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) (Diptera: Ceratopogonidae) byli jako hmyz s denní aktivitou chytáni hlavně do CDC pastí s vypnutým světlem a vsazeným zdrojem CO₂.

Pro tento experiment bylo odchyceno 3048 flebotomů (1885 samic, 1163 samečů) a 225 tiplíků. Celkem 1818 samic flebotomů bylo analyzováno metodou PCR pro nalezení DNA leishmanií, všechny výsledky však byly negativní. U tiplíků *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) byla provedena analýza PCR i pitva. Z celkového počtu 225 kusů bylo 5,8 % pozitivních na leishmanie. Konkrétně PCR pozitivních bylo 9 ze 157 vzorků. Při pitvách se podařilo objevit přítomnost promastigotů ve střevě zkoumaného hmyzu u 4 ze 68 vzorků. V jednom případě byla u defekované samice dokonce pozorována v thorakálním mesenteronu "zátka" podobná PSG a metacyklické formy leishmanií.

Ačkoli původním cílem této studie bylo hledat vektory leishmanií mezi flebotomy, výsledky naznačují, že v Austrálii by mohli jako přenašeči leishmanií fungovat spíše tiplíci rodu *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) (Dougall et al., 2011).

Terénní studii zaměřenou přímo na přenos leishmanií alternativním přenašečem - tiplíkem (*Culicoides*) - prováděli Slama et al. (2014). V letech 2009 a 2010 proběhl pomocí světelných pastí sběr tiplíků ve venkovských oblastech středního Tuniska. Celkem bylo odchyceno a následně testováno 259 samic sedmi druhů rodu *Culicoides* (nejvíce zastoupeným druhem byl *C. imicola*). Pomocí metody PCR byla detekována DNA *L. infantum* ve střevech 15 jedinců (14 z nich bylo *C. imicola*, jeden *C. circumscriptus*). Tato studie tedy poprvé zaznamenala DNA leishmanií u volně žijících tiplíků Starého světa.

(Slama et al. 2014). Nemůže být ale pokládána za důkaz, že tiplíci jsou zapojeni do přenosu *L. infantum*, jak svou studii interpretovali autoři (Seblova et al., 2014).

Tiplíci rodu *Culicoides* jsou v oblastech s výskytem CL velmi aktivním druhem hmyzu. Rozsáhlou terénní studii zabývající se detekcí leishmanií v tiplících prováděl tým Rebêlo et al. (2016) v Brazílii. Ve vesnicích v SV Brazílii, konkrétně v oblasti, kde se původně nacházel amazonský deštný prales, byly instalovány světelné pasti, do kterých byl chytán hmyz. Vybrány byly pouze samice tiplíků rodu *Culicoides*. Zachyceno bylo celkem 3497 jedinců ze 14 druhů tiplíků *Culicoides*. Mezi nejpočetnější patřili: *C. foxi*, *C. insignis*, *C. filariferus*, *C. ignacioi* a *C. flavivenula*. Následně použitá molekulární analýza DNA odhalila přítomnost *L. braziliensis* u tiplíku *C. foxi*, *C. ignacioi*, a *C. insignis* a *L. amazonensis* u tiplíků *C. filariferus* a *C. flavivenula*. Tyto dva druhy leishmanií jsou původci kožní i kožně-slizniční leishmání. Autoři studie se domnívali, že objev jejich DNA u tiplíků může teoreticky vysvětlit šíření tohoto onemocnění ve zkoumané oblasti. Tiplíci se vyskytují ve stejných biotopech, jako druhy flebotomů (v tomto případě *Lutzomyia* spp.), které jsou prokázanými vektory těchto leishmanií. Podle výsledků testů krve ze střeva tiplíků, je patrné, že sají na drůbeži, koních, skotu, hlodavcích a lidech, tedy mají stejné hostitele, jako výše zmínění flebotomové, přičemž někteří z uvedených savců jsou známými rezervoáry leishmanií.

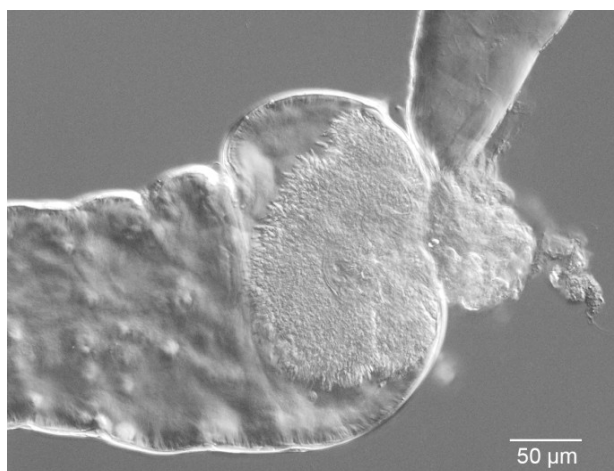
Seblova et al. (2012) prováděli laboratorní studii zkoumající vektorovou kompetenci tiplíků rodu *Culicoides nubeculosus* pro přenos dvou medicínsky významných druhů leishmanií Starého světa, a to *L. infantum* a *L. major*. Samice tiplíků byly experimentálně nasáty přes kuřecí membránu králíčí krvi smíchanou s promastigoty *L. infantum*. První, druhý, třetí, sedmý a desátý den po nasátí krve (PBM) byly samičky rozpitvány a jejich střeva pozorována pomocí světelného mikroskopu. První den PBM byla infekce silná a zjistitelná u většiny samic. Postupně však klesala, třetí den byla velmi nízká a po sedmi a deseti dnech již nebyla infekce leishmanií pozorována v žádné ze zkoumaných samic. Výsledky pokusů s *L. major* byly obdobné. Parazit byl ve střevě infikovaných samic detekován pouze do doby, kdy je samičky vyloučily spolu s defekací zbytků potravy. V rámci této studie byl také testován účinek dvou různých inhibitorů proteáz na vývoj leishmanií (*L. infantum*) ve střevě tiplíků (*C. nubeculosus*). Výsledky však neprokázaly, že by inhibitory proteáz zásadně napomohly přežití a vývoji leishmanií ve střevě tiplíků. Výsledky této studie tedy ukazují, že promastigoti ani jednoho ze

zkoumaných druhů leishmanií nejsou schopni se přichytit k epitelu střeva tiplíka druhu *C. nubeculosus* či přežít účinek střevních proteáz a jsou proto vydefekováni (Seblova et al., 2012).

Seblova et al. (2015) poté studovali vektorovou kompetenci tiplíků pro přenos *L. entriettii* a *L. macropodum*. Pro výzkum použili dva druhy tiplíků - *Culicoides* (*Monoculicoides*) *sonorensis* a *C. (M.) nubeculosus*. Samičky obou druhů tiplíků se přes membránu nasály králíčí krví, která byla infikována promastigoty dvou druhů leishmanií: *L. entriettii* a *L. macropodum*. Následně byly v 1. - 2., 3., 5. - 6. a 9. - 10. dni PBM rozpitvány. Pomocí světelného mikroskopu byl ve střevě pozorován vývoj infekce leishmanií. Pro porovnání bylo totéž provedeno s neotropickým druhem flebotoma *Lu. longipalpis*.

První dva dny bylo procento infikovaných samic *Lu. longipalpis* vysoké (70-80%), třetí den, po defekaci, kleslo na 40%. Mezi 5 - 10 dnem byly pozorovány jen slabé infekce *L. entriettii* a nikdy nebyla kolonizována SV. V případě *L. macropodum* bylo procento infikovaných samic o něco vyšší a pozorována byla i kolonizace SV. V *C. nubeculosus* nebyla zaznamenána pozdní infekce ani kolonizace SV. Tiplíci *C. sonorensis* vykazovali vysoké procento infikovaných samic oběma druhy leishmanií první dva dny po nasátí. Po defekaci procento infikovaných samic opět výrazně kleslo. Důležité ovšem je, že u *C. sonorensis* promastigoti obou druhů migrovali do předního mesenteronu a následně kolonizovali SV u více než 20 % samic (viz obr. 3).

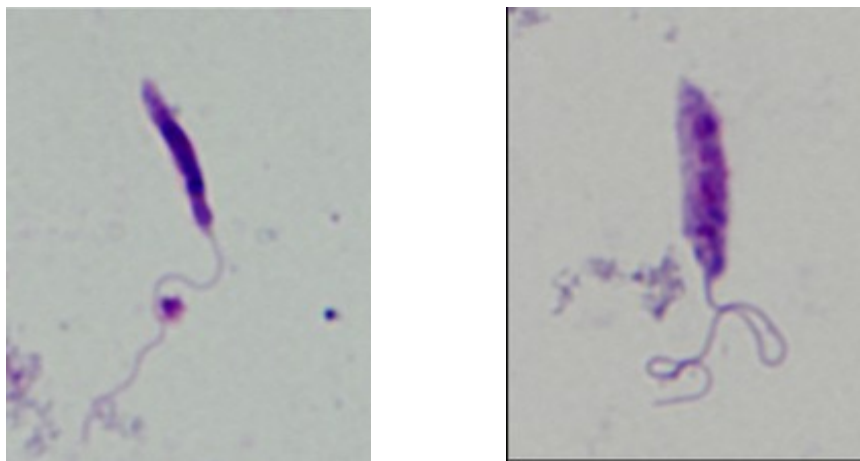
Obr. 3.: Mesenteron samice *C. sonorensis* s promastigoty *L. entriettii* kolonizujícími SV.



Zdroj: Seblova et al., 2015.

Morfologická analýza prokázala ve střevě *L. longipalpis* i *C. sonorensis* přítomnost metacyklických promastigotů *L. entriettii* (viz obr. 4)

Obr. 4: Metacyklickí promastigoti *L. entriettii* ve střevě *C. sonorensis*.



Zdroj: Seblova et al., 2015.

V rámci této studie byl také proveden pokus, kdy byli tiplíci *C. sonorensis* infikováni třemi druhy leishmanií infekčními pro lidi: *L. major*, *L. infantum* a *L. donovani*. Výsledky však byly negativní. Infekce byla první dny PBM vysoká, avšak po defekaci byla většina vzorků bez infekce, jen u třech samic tiplíků byly pozorovány dlouhé nektomonády (*L. donovani*), ale jen v abdominálním mesenteronu. Nebyla zaznamenána migrace do přední části trávicího traktu ani kolonizace SV.

Dále bylo testováno, zda se *L. longipalpis* a *C. sonorensis* nakazí sáním na morčatech (*Cavia porcellus*) a zlatých křečcích (*Mesocricetus auratus*). Křečci a morčata byla intradermálně infikována promastigoty do oblasti uší a nosu. Po 3, 4, 7, 9 a 12 týdnech byla na infikovaných zvířatech proveden xenodiagnostika s využitím *Lu. longipalpis* a *C. sonorensis*. Samičkám obou druhů hmyzu byla dána možnost nasát se na místech, kam byla zvířatům (která byla v celkové narkóze) naočkována infekce. Po dvou dnech od nasátí byla u hmyzu provedena analýza metodou PCR. Křečci a morčata byli po poslední xenodiagnóze usmrceni a byla jim odebrána tkáň z uší a nosu, dále lymfatické uzliny, slezina a játra. Zajímavé je, že u křečků se, na rozdíl od morčat, infekce projevila jen zarudnutím, či malými otoky a noduly, které však po několik týdnech samy vymizely a infekce nebyla na konci experimentu u křečků patrná. Oproti tomu u morčat byl její

průběh mnohem výraznější; nejprve se objevilo zarudnutí a otoky, později kožní léze. Projevy infekce se časem zhoršovaly. Výsledky PCR u morčat ukázaly velké množství parazita nejen v místech, kam byla infekce injikována, ale i v dalších orgánech. U křečků byly nálezy v místech infekce velmi nízké, v jiných orgánech nebyly žádné. Celkem ze 112 nasátých *C. sonorensis*, jež sáli na oblastech nosu a uší zlatých křečků infikovaných *L. entriettii*, nebyl žádný na leishmanií pozitivní. Naopak v případě xenodiagnostických pokusů prováděných na morčatech se procento infikovaných *C. sonorensis* pohybovalo mezi 50 a 80 %. Studie tedy ukázala, že určité druhy leishmanií jsou schopny vývoje v některých druzích tiplíků. Ve skutečnosti ovšem ani jeden z uvedených druhů nemůže být vektorem *L. entriettii*, jelikož *C. sonorensis* pochází ze Severní Ameriky a *C. nubeculosus* z Evropy, zatímco *L. entriettii* se vyskytuje v Brazílii a *L. macropodum* v Austrálii.

Všechny tyto studie naznačují, že by tiplíci opravdu mohli být vektory leishmanií. Obzvláště studie Dougall et al. (2011), kdy u infikovaných jedinců z přírody byla i po defekaci nalezena silná infekce thorakálního mesenteronu s tvorbou zátky podobné PSG zátce tvořené leishmaniami ve flebotomech a přítomností metacyklických forem leishmanií. Vektorovou kompetenci tiplíků a jejich schopnost podporovat vývoj některých druhů leishmanií pak prokázala laboratorní studie Seblova et al. (2015), když se u experimentálně infikovaných tiplíků vyvinuly zralé infekce s kolonizací SV a přítomností metacyklických forem promastigotů. Prozatím se však nepodařil experimentální přenos na hostitele sáním infikovaných tiplíků. Terénní studie Rebêlo et al. (2016) zase ukázala přítomnost DNA leishmanií v mnoha druzích tiplíků, kteří sají na stejných hostitelích, jako flebotomové a zároveň rezervoárových hostitelích leishmanií. Tiplíci se tedy vyskytují ve stejném biotopu jako rezervoároví hostitelé leishmanií a zároveň na nich běžně sají. Přesto je stále zapotřebí dalšího výzkumu, a to jak terénního, jenž by blíže popsal vztah tiplíků s rezervoárovými hostiteli včetně dynamiky jejich výskytu, tak laboratorního, zaměřeného například na výzkum slin různých druhů tiplíků a zhodnocení jejich podobnosti se slinami flebotomů.

Závěrem tedy lze konstatovat, že ze všech prozatím uvažovaných hematofágních členovců jsou právě tiplíci nejpravděpodobnějšími alternativními vektory leishmanií. Tato jejich vektorová kapacita však bude velmi pravděpodobně omezena na leishmanie z podrodu *Mundinia*.

6 Závěr

Díky rozvoji molekulárních metod v posledních desetiletích, lze provádět podrobné laboratorní i terénní výzkumy, které pomáhají odhalit zapojení různých skupin členovců do přenosu leishmanií. Ve své bakalářské práci jsem shrnula dosavadní zásadní práce zabývající se alternativními vektory leishmanií.

Na základě výsledků výše uvedených prací a v souladu s kritérii vektorové kompetence (viz Tab. 2) lze konstatovat, že v současné době můžeme za přenašeče leishmanií téměř s jistotou považovat tiplíky. Chybí jen konečný důkaz v podobě úspěšného přenosu leishmanií sáním tiplíků na hostiteli. V Austrálii je přenos *L. macropodium* tiplíky rodu *Forcipomyia* zřejmě hlavním mechanismem kolování parazita. Potenciál k vývoji v tiplících má i jihoamerická *L. enreittii* a možná i další druhy podrodu *Mundinia*, u kterých přenašeči zatím nebyli popsáni. U ostatních medicínsky významných leishmanií (podrody *Leishmania* a *Viannia*) ale není zapojení tiplíků do přenosu příliš pravděpodobné.

Vážně je třeba uvažovat také o roli klíšťat, přinejmenším v přenosu *L. infantum* mezi psy. Leishmanie v klíšťatech *R. sanguineus* přežívají ekdzy, přenáší se i transovariálně a jsou lokalizovány také ve slinných žlázách, což zvyšuje jejich šanci přenosu na hostitele. Nicméně stále není jasné, zda leishmanie dokážou v klíšťatech dokončit svůj funkční vývoj a vytvořit metacyklické formy schopné přežít přenos na imunokompetentního hostitele.

Daleko méně podpůrných důkazů lze v současné době najít pro zapojení blech či jiných krevsajících členovců (vší) do přenosu leishmanií a pokud je někteří autoři mezi alternativní přenašeče zahrnují, je nezbytné k těmto závěrům přistupovat kriticky.

Můžeme předpokládat, že další laboratorní i terénní výzkum v této oblasti přinese mnohé další zajímavé a třeba i nečekané objevy a dočkáme se definitivního potvrzení či vyvrácení rolí uvedených skupin krevsajících členovců v koloběhu leishmanií.

Tab. 2: Zhodnocení vektorové kompetence klíšťat, blech a tiplíků pro přenos leishmanií

KRITÉRIA VEKTOROVÉ KOMPETENCE	KLÍŠŤATA	BLECHY	TIPLÍCI
Výskyt V a RH ve stejném biotopu	+	+	+
V běžně saje na RH	+	+	+
Izolace P z V po defekaci zbytků krve	+	?	+
P izolovaný z V je totožný s P izolovaným z H	+	+	+
V podporuje vývoj P	+/- ¹	?	+
Infekce ve V vrcholí lokalizací vhodnou pro přenos na RH	Slinné žlázy	?	TM a SV +
V přenáší P při sání na RH v přírodě	?	?	?
V laboratorních podmínkách se podařil experimentální přenos z/na RH	+ ²	-	+/- ³

¹ Transstadiální a transvariální vývoj ve **V**.

² Jeden zdařilý přenos sáním na imunosuprimovaného psa (McKenzie (1984) ex Dantas-Torres, 2011).

³ Zdařilé infekce tiplíků sáním na infikovaném hostiteli, ale zatím neprokázán přenos sáním tiplíků na hostitele.

? – na základě publikovaných informací zatím nelze zodpovědět.

V – vektor

RH – rezervoárový hostitel (pes)

P – parazit (*L. infantum*)

TM – thorakální mesenteron

SV – stomodeální valva

Seznam referencí

- ACOSTA, I. Da C. L., A. P. DA COSTA, S. M. GENNARI a A. MARCILI. Survey of Trypanosoma and Leishmania in Wild and Domestic Animals in an Atlantic Rainforest Fragment and Surroundings in the State of Espírito Santo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 2014, **51**(3), 686-693. DOI: 10.1603/ME13177.
- ADLER, S. a O. THEODOR. Investigations on Mediterranean Kala Azar. IX.--Feeding Experiments with Phlebotomus perniciosus and other Species on Animals Infected with Leishmania infantum. *The Royal Society Publishing*. 1935, **116**(801), 516-542.
- ALVAR, J., I.D. VÉLEZ, C. BERN, M. HERRERO, P. DESJEUX, J. CANO, J. JANNIN a M DEN BOER. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos one* [online]. 2012, **7**(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0035671. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671#abstract0>
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. *Clinics in Dermatology*. 1996, **14**, 523-532.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* [online]. 2000, **30**(12-13), 1269-1281. DOI: 10.1016/S0020-7519(00)00136-3. ISSN 00207519. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751900001363>
- BANETH, G. Tick-borne infection of animals and humans: a common ground. *International Journal for Parasitology*. 2014, **44**, 591-596.
- BARRATT, J., A. KAUFER, B PETERS, et al. Isolation of Novel Trypanosomatid, Zelonia australiensis sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Provides Support for a Gondwanan Origin of Dixerous Parasitism in the Leishmaniinae. *Plos*. 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005215.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* [online]. 2007, **37**(10), 1097-1106. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003. ISSN 00207519. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751907001269>
- COLOMBO, F. A., R. M. F. N. ODORIZZI, M. D. LAURENTI, E. A. B. GALATI, F. CANAVEZ a V. L. PEREIRA-CHIOCCOLA. Detection of Leishmania (Leishmania) infantum RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res*. 2011, **109**, 267–274.

- COUTINHO, M. T. Z., L. L. BUENO, A. STERZIK, R. T. FUJIWARA, J. R. BOTELHO, M. DE MARIA, O. GENARO a P. M. LINARDI. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* [online]. 2005, **128**, 149-155. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.11.011. ISSN 03044017.
- COUTINHO, M.T.Z., L.L. BUENO, A. STERZIK, R.T. FUJIWARA, J.R. BOTELHO, M. DE MARIA a O. GENARO. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2005, , 149-155. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>.
- COUTINHO, M.T.Z. a P.M. LINARDI. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*. 2007, **147**(3-4), 320-325. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.04.008.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology*. 2011, **27**(4), 155–159.
- DANTAS-TORRES, F., M. S. LATROFA a D. OTRANTO. *Quantification of Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. 2011, **4**, 56.
- DANTAS-TORRES, F., V. LORUSSO, G. TESTINI, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research*. 2010a, **106**(4), 857-860. DOI: 10.1007/s00436-010-1722-4.
- DANTAS-TORRES, F., T. F. MARTINS, M. PAIVA-CAVALCANTI, L. A. FIGUEREDO, B. S. LIMA a S. P. BRANDÃO-FILHO. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Experimental Parasitology*. 2010b, **125**(2), 184–185.
- DE MORAIS, R. C. S., S. C. GONÇALVES, P. L. COSTA, et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Exp Appl Acarol*. 2013, **59**, 473–481.
- DILLON, R. J. a P. LANE. Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Medical and Veterinary Entomology*. 1993, **7**(3), 225–232.
- DOSTALOVA, A. a P. VOLF. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*. 2012, **5**, 276-. DOI: 10.1186/1756-3305-5-276.

- DOUGALL, A.M., B. ALEXANDER, D.C. HOLT, T. HARRIS, A.H. SULTAN, P.A. BATES, K. ROSE a S.F. WALTON. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of Leishmania in Australia. *International Journal for Parasitology*. 2011, **41**(5), 571-579.
- ESPINOSA, O. A., M. G. SERRANO, E. P. CAMARGO, M. M. TEIXEIRA a J. J. SHAW. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. *Parasitology*. 2016, , 1-13. DOI: 10.1017/S0031182016002092.
- FERREIRAA, M. G. P. A., K. R. FATTORIB, F. SOUZAA a V. M. F. LIMAA. Potential role of dogs fleas in the cycle of Leishmania spp. *Veterinary Parasitology*. 2009, **165**(1-2), 150-154.
- CHRISTOPHERS, S. R., H. E. SHORTT a P. J. BARRAUD. The Development of the Parasite of Indian Kala-Azar in the Sandfly Phlebotomus argentipes Annandale and Brunetti. *Indian Journal of Medical Research*. 1925, **12**(3), 605-607.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*. 2006, **22**(9), 439–445.
- KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*. 1999, (17), 279-289.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomina vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*. 1990, **4**(1), 1-24. DOI: 10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x.
- KILLICK-KENDRICK, R., M. KILLICK-KENDRICK, Y. TANG a P. BASTIEN. Metacyclic promastigotes of Leishmania in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*. 1996, **3**(1), 55-60.
- LAWYER, P. G. a P. V. PERKINS. *Medical Entomology: Leishmaniasis and Trypanosomiasis*. Kluwer Academic Publishers, 2000, s. 231-298. ISBN 978-94-011-6472-6.
- LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*. 1997, **42**, 525-550.
- MAIA, C. a J. DEPAQUIT. Can Sergentomyia (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting Leishmania? *Parasite* [online]. 2016, **23**. DOI: 10.1051/parasite/2016062. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5159824/>

- MARTIN-SANCHEZ, J., M. GALLEGO, S. BARON, S. CASTILLEJO a F. MORILLAS-MARQUEZ. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Science Direct*. 2006, **100**, 527—532.
- MAURICIO, I. L., J. R. STOTHARD a M. A. MILES. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology today*. 2000, **16**(5), 188-189.
- MEDEIROS-SILVA, V., R. GURGEL-GONÇALVES, N. NITZ a . *Successful isolation of Leishmania infantum from Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs* [online]. 2015, **11**, 258. DOI: 10.1186/s12917-015-0576-5. Dostupné z: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0576-5>
- MELLOR, P. S., J. BOORMAN a M. BAYLIS. Culicoides Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors. *Annual Review of Entomology* [online]. 2000, , Vol. 45:307-340. DOI: 10.1146/annurev.ento.45.1.307. Dostupné z: <http://annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.ento.45.1.307>
- MYSKOVA, Jitka, Milena SVOBODOVA, Stephen M. BEVERLEY a Petr VOLF. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection* [online]. 2007, **9**(3), 317-324 [cit. 2017-05-11]. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.12.010. ISSN 12864579. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457907000093>
- OTRANTO, D. a F. DANTAS-TORRES. Fleas and ticks as vector of *Leishmania* spp. to dogs: Caution is needed. *Veterinary Parasitology*. 2010, **168**, 173-174.
- PAZ, G. F., M. F. B. RIBEIRO, D. F. DE MAGALHÃES, et al. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case–control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Preventive Veterinary Medicine*. 2010b, **97**, 131–133.
- PAZ, G. F., M. F. B. RIBEIRO, E. M. MICHALSKY, A. C. V. M. R. LIMA, J. C. FRANÇA-SILVA, R. A. BARATA, C. L. FORTES-DIAS a E. S. DIAS. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*. 2010a, **106**, 523. DOI: 10.1007/s00436-009-1697-1.
- PEARSON, R. D. a A. Q. SOUSA. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*. 1996, **22**(1), 1-13.

- PIMENTA, P. F. P., G. B. MODI, S. T. PEREIRA a M. SHAHABUDDIN. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 1997, **115**(4), 359-369.
- RAMALHO-ORTIGAO, M., E. M. SARAIVA a Y. M. TRAUB-CSEKÖ. Sand Fly-*Leishmania* Interaction: Long Relationships are Necessarily Easy. *The Open Parasitology Journal*. 2010, **4**, 195-204.
- READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*. 2013, **58**, 227-250.
- REBÊLO, J.M.M., B.L. RODRIGUES, M.C.A. BANDEIRA, J.L.P. MORAES, R.S. FONTELES a S.R.F. PEREIRA. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. *Journal of Vector Ecology* [online]. 2016, **41**(2), 303-308. DOI: 10.1111/jvec.12227. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvec.12227/full>
- ROGERS, M. E., M. HAJMOVA, M. B. JOSHI, J. SADLOVA, D. M. DWYER, P. VOLF a P. A. BATES. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular Microbiology*. 2008, **37**(6), 1363-1372. DOI: doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003.
- ROGERS, M. E., M. L. CHANCE a P. A. BATES. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Cambridge University Press*. 2002, **124**(5), 495-507. DOI: 10.1017/S0031182002001439.
- ROGERS, M. E., T. ILG, A. V. NIKOLAEV, M. A. J. FERGUSON a P. A. BATES. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004, **430**, 463-467.
- ROSE, K., J. CURTIS, T. BALDWIN, et al. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *International Journal for Parasitology*. 2004, **34**, 655–664.
- SACKS, D. L., G. MODI, E. ROWTON, G. SPÄTH, L. EPSTEIN, S. J. TURCO a S. M. BEVERLEY. The role of phosphoglycans in *Leishmania*–sand fly interactions. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2000, **97**(1), 406–411.
- SADLOVA, J. The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 1999, **63**, 331-366.

- SEBLOVA, V., J. SADLOVA, S. CARPENTER a P. VOLF. Development of Leishmania Parasites in Culicoides nubeculosus (Diptera: Ceratopogonidae) and Implication for Screening Vector Competence. *Journal of Medical Entomology*. 2012, **49**(5), 967-970.
- SEBLOVA, V., J. SADLOVA, S. CARPENTER a P. VOLF. Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of Leishmania. *Parasites & Vectors*. 2014, **7**, 222. DOI: 10.1186/1756-3305-7-222.
- SEBLOVA, V., J. SADLOVA, B. VOJTKOVA, J. VOTYPKA, S. CARPENTER, P. A. BATES a P. VOLF. The Biting Midge Culicoides sonorensis (Diptera: Ceratopogonidae) Is Capable of Developing Late Stage Infection of Leishmania entriettii. *Plos*. 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004060.
- SHORTT, H. E. a C. S. SWAMINATH. The Method of Feeding of Phlebotomus argentipes with Relation to its Bearing on the Transmission of Kala-Azar. *Indian Journal of Medical Research*. 1928, **15**(3), 827-836.
- SCHLEIN, Y. Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*. 1993, **9**(7), 255-258. DOI: 10.1016/0169-4758(93)90070-V.
- SCHLEIN, Y. a R. L. JACOBSON. Haemoglobin inhibits the development of infective promastigotes and chitinase secretion in Leishmania major cultures. *Parasitology*. 1994, **109**(1), 23-28.
- SLAMA, D., N. HAOUAS, L. REMADI, H. MEZHOUD, H. BABBA a E. CHAKER. First detection of Leishmania infantum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Culicoides spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasites & Vectors* [online]. 2014, **7**(1), 51-. DOI: 10.1186/1756-3305-7-51. ISSN 17563305. Dostupné z: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-51>
- SOLANO-GALLEGO, L., L. ROSSI, A. M. SCROCCARO, F. MONTARSI, M. CALDIN, T. FURLANELLO a M. TROTTA. Detection of Leishmania infantum DNA mainly in Rhipicephalus sanguineus male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. 2012, **5**, 98.
- TROTTA, M., M. NICETTO, A. FOGLIAZZA, F. MONTARSI, M. CALDIN, T. FURLANELLO a L. SOLANO-GALLEGO. Detection of Leishmania infantum, Babesia canis, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2012, **3**, 293–296.

- TYC, J., J. VOTYPKA, H. KLEPETKOVA, H. SULAKOVA, M. JIRKU a J. LUKES. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): Frequent cosmopolitism and moderate host specificity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2013, **69**, 255–264.
- VOLF, P., M. HAJMOVA, J. SADLOVA a J. VOTYPKA. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*. 2004, **34**(11), 1221–1227. DOI: 10.1016/j.ijpara.2004.07.010.
- VOLF, P. a P. HORÁK. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007. ISBN 978-80-7387-088-9.
- WALKER, J. B., J. E. KEIRANS a I. G. HORAK. *The genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae)* [online]. 2000. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. ISBN 13 978-0-521-48008-6. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=M9fLCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=ixodidae&ots=MKSVyNwNPG&sig=TH9PYQ2_65F6_BuEsPhkMhvvseI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true
- WENYON, C.M. The transmission of leishmania infections: A review. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1932, **25**(5), 319-332.